

## VERWENDUNG VON INHIBITOREN DER PLASMAMEMBRAN-CALCIUM-ATPASE (PMCA) ZUR HEMMUNG DER SPERMENMOBILITÄT

BEST AVAILABLE COPY

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Inhibitoren der Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) zur Hemmung der Spermienmobilität zur Erzielung einer empfängnisverhütenden Wirkung. Weiterhin betrifft die Erfindung Empfängnisverhütungsmittel, die einen oder mehrere PMCA-Inhibitoren enthalten.

### GEBIET DER ERFINDUNG

Je nach sozialen, geographischen und religiösen/ ethischen Gegebenheiten werden zur Zeit folgende verschiedene Verfahren zur Empfängnisverhütung mit unterschiedlicher Zuverlässigkeit angewandt: 1) Kontrazeption ohne Anwendung mechanischer oder chemischer Mittel („natürliche Verfahren“); 2) Kontrazeption durch Barrieverfahren, dazu zählen die Anwendung von Präservativen, Okklusivpessar und Scheidendiaphragma; 3) Kontrazeption durch lokal wirkende Substanzen, in der Regel Spermizide; 4) Hormonale Kontrazeption bei der Frau durch regelmäßige Einnahme östrogen- und/oder gestagenhaltiger Präparate nach einem bestimmten Schema; 5) Intrauterine Kontrazeption mittels Intrauterinpessar und 6) Operative Sterilisation des Mannes bzw. der Frau.

Die hormonale Kontrazeption stellt hierbei mit großem Abstand das am weitesten verbreitete Verfahren dar. Es ist zuverlässig in der Verhütung von Schwangerschaften und meist reversibel, d.h., nach Absetzen der Präparate aufgrund von Kinderwunsch kommt es in der überwiegenden Zahl der Fälle zur Schwangerschaft. Ungünstigerweise sind jedoch auch zahlreiche absolute und relative Kontraindikationen der hormonalen Kontrazeption bekannt. Zu den absoluten Kontraindikationen der hormonalen Kontrazeption gehören Thrombosen, Embolien, thromboembolische Erkrankungen, akute und progradiente Lebererkrankungen,

hormonabhängige maligne Tumoren, Störungen der Gallensekretion, Sichelzellanämie, Diabetes mellitus mit Gefäßschäden, schwer einstellbare Hypertonie und andere Faktoren. Beispiele für relative Kontraindikationen sind Niereninsuffizienz, Herzinsuffizienz, Raynaud-Syndrom, periphere Durchblutungsstörungen, Ödeme, Nikotinkonsum und andere.

Im Vergleich zur hormonalen Kontrazeption sind Verfahren der „natürlichen Kontrazeption“ zwar meist nicht kontraindiziert, jedoch sehr unzuverlässig und auch durch eine unakzeptable hohe Versagerquote gekennzeichnet.

Mechanische Verfahren wie Pessare und Sterilisation weisen ebenfalls erhebliche Nachteile aufgrund höherer Komplikationsraten (Pessare) bzw. wegen ihrer weitgehenden Irreversibilität (Sterilisation) auf.

Zusammengefasst lässt sich daher feststellen, dass die herkömmlichen Verfahren der Empfängnisverhütung unter erheblichen Nachteilen leiden. Ein weiterer nachteiliger Faktor besteht darin, dass das sichere Verfahren zur Empfängnisverhütung, die hormonale Kontrazeption, bisher erfolgreich nur von der Frau angewandt werden kann, wobei jedoch die generell verbreitete Auffassung darin besteht, dass die Empfängnisverhütung nicht nur eine zentrale Aufgabe der Frau, sondern beider Partner ist.

Dieser Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, neuartige nicht-hormonale Verhütungsmittel als oral oder parenteral zu applizierende Präparate oder spermizide Substanzen bereitzustellen, die sowohl von der Frau als auch vom Mann angewandt werden können.

Die Erfindung wird durch die folgenden Abbildungen veranschaulicht.

## KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

**Abb. 1:** Expression der PMCA4 im Spermium. **A.** Mausspermien weisen eine starke Expression der PCMA4 im Akrosom und im Schwanz auf (rote Färbung, 2. Bild in A). Im Vergleich dazu das Phasenkontrastbild des isolierten Spermiums. Die beiden rechten Bilder zeigen die Negativ-Kontrolle des sekundären Antikörpers alleine im Vergleich zur Phasenkontrast-Aufnahme der beiden Spermien. **B.** Ebenso wie die Mausspermien exprimieren humane Spermien die PMCA4 im Akrosom und Schwanz. Exemplarisch ist hier nur die Färbung der PCMA4 dargestellt.

**Abb. 2:** Infertilität in PMCA4-defizienten Mäusen. *A.* Durch eine geeignete Strategie konnte das PMCA4-Gen in der Maus ausgeschaltet werden. Unter Zuhilfenahme eines sog. „Targeting-Vektors“ wurde mittels homologer Rekombination ein Exon komplett und ein Teil eines weiteren Exons deletiert. *B.* Die Genmanipulation resultierte in einem vollständigen Verlust der Genexpression in PMCA4-defizienten Mäusen („ko“), wohingegen die normalen Mäuse die PCMA4 stark in Spermien exprimieren („wt“). M = Marker zur Größenbestimmung des RT-PCR-Produkts. *C.* Die nach der Genmanipulation erhaltenen männlichen PMCA4-defizienten Tiere (ko) sind infertil, unabhängig davon, ob man sie mit normalen oder ebenfalls PMCA4-defizienten weiblichen Tieren verpaart.

**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Wirkungsweise der PMCA-Inhibitoren. Extrazellulär an die PMCA (weiss) bindende Inhibitoren (grau dargestellt) wirken direkt, während intrazellulär wirkende Substanzen (schwarz) die Zellmembran passieren müssen und dort ihre Wirkung entfalten können.

## AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Inhibitoren der Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) zur Hemmung der Spermienmobilität, wodurch eine empfängnisverhütende Wirkung erzielt wird.

Die Erfindung ist weiterhin auf Empfängnisverhütungsmittel gerichtet, die einen oder mehrere PMCA-Inhibitoren enthalten. Diese Empfängnisverhütungsmittel können zusätzlich zu den PMCA-Inhibitoren weiterhin konventionelle Empfängnisverhütungsmittel enthalten.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Empfängnisverhütung, wobei ein Inhibitor der Plasmamembran-Calcium-ATPase an einen Säuger verabreicht wird.

Erfindungsgemäß werden zur Erzielung einer empfängnisverhütenden Wirkung ein oder mehrere Inhibitoren der Plasmamembran-Calcium-ATPase verwendet. Dieses Enzym transportiert Kalzium aus dem Zytosol in das Extrazellulärmilieu und weist Homologie zu einigen anderen ATPasen auf, einschließlich der SERCA ATPase und der Natrium/K+-Pumpe. PMCA wird von vier verschiedenen Genen (PMCA1-4) kodiert und Untersuchungen zeigten die Existenz mehrerer Isoformen der PMCA auf, die durch alternatives Splicing der primären Genprodukte erzeugt werden. Während die Genprodukte 1 und 4 in den meisten

Geweben transkribiert werden, werden die Produkte 2 und 3 eher gewebespezifisch exprimiert. Die Transkription der Splice-Varianten ist ebenfalls gewebespezifisch. So exprimieren z.B. die  $\beta$ -Zellen des Pankreas lediglich die 4b Isoform, wobei die alpha- und gamma-Zellen sowohl die 4a, als auch die 4b Isoformen exprimieren. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass unterschiedliche Splice-Varianten unterschiedliche Affinitäten für Kalzium und Calmodulin haben.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Beobachtung, dass männliche Mäuse, die für die Isoform 4 der murinen PMCA defizient sind (sog. „knock-out“ Mäuse) infertil sind. Die Tiere sind ansonsten vital und entwickeln sich normal. Weiterhin kann bei diesen Tieren keine erektilen Dysfunktionen beobachtet werden. Überraschenderweise konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Mobilität der Spermien der PMCA4-„knockout“-Mäuse soweit eingeschränkt ist, dass keine Befruchtung der Eizelle stattfinden kann und die Tiere somit nicht fähig sind, sich fortzupflanzen. Es handelt sich somit um einen hochspezifischen, auf die Spermien beschränkten Effekt.

In menschlichen Spermien wird PMCA4 ebenfalls exprimiert. Die mit den PMCA4-„knockout“-Mäusen erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass menschliche Spermien durch die Verwendung von PMCA-Inhibitoren ebenfalls so in ihrer Mobilität eingeschränkt werden können, dass keine Befruchtung der weiblichen Eizelle mehr möglich ist.

Die spezifische physiologische Bedeutung der PMCA für die Spermienfunktion ist bis jetzt unbekannt. Weiterhin gab es bis jetzt keine Hinweise, dass die Verwendung von PMCA-Inhibitoren die Mobilität der Spermien hemmt. Die Verwendung von PMCA-Inhibitoren zur Hemmung der Spermienmobilität zur Erzielung einer empfängnisverhütenden Wirkung wird somit hier zum ersten Mal gezeigt.

Die empfängnisverhütende Wirkung, d.h. die Verhinderung der Verschmelzung eines Spermiums mit einer Eizelle beruht auf der Hemmung der Spermienmobilität durch PMCA-Inhibitoren, die dazu führt, dass die Spermien die Eizelle nicht mehr befruchten können.

Die empfängnisverhütende Wirkung wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von PMCA-Inhibitoren erzielt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Inhibitor gegen eine der vier Isoformen der Plasmamembran-Calcium-ATPase PMCA gerichtet. Insbesondere bevorzugt wird dabei ein Inhibitor, der gegen die Isoform PMCA4 gerichtet ist.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Inhibitoren der PMCA lassen sich in intrazellulär und extrazellulär wirkende Inhibitoren einteilen. Erfindungsgemäß wird die Verwendung entweder eines extrazellulären oder eines intrazellulären Inhibitors alleine als auch in Kombination beabsichtigt. Dabei können Kombinationen verwendet werden, die entweder mehrere intrazelluläre bzw. mehrere extrazelluläre Inhibitoren enthalten als auch Kombinationen, die intrazelluläre als auch extrazelluläre Inhibitoren umfassen.

Bekannte Inhibitoren der PMCA, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind *5-(und-6)-Carboxyeosindiacetat-succinimidylester* (ein Zellmembran-gängiger Inhibitor der PMCA), das extrazellulär auf die PMCA wirkende Peptid Caloxin 2A1 und das Polykation Spermin.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden *5-(und-6)-Carboxyeosindiacetat-succinimidylester* (150347-60-7 / 2,5-Pyrrolidinedione, 1-[[[3',6'-bis(acetyloxy)-2',4',5',7'-tetrabromospiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-5(or 6)-yl]carbonyl]oxy]) oder Derivate davon als Inhibitor der PMCA in Spermien verwendet.

Insbesonders bevorzugte Derivate dieses Inhibitors sind die entsprechenden Eosin- und Fluorescein-Derivate (Gatto, C. & Milanik, M. A. (1993), *American Journal of Physiology* 264, C1577-1586).

Von dem Zellmembran-gängigen Inhibitor *5-(und-6)-Carboxyeosindiacetat-succinimidylester* existieren schon verschiedenste Eosin-, Fluorescein-, und Fluorescin-Derivate und deren Salze sowie dem *5-(und-6)-Carboxyeosindiacetat-succinimidylester* entsprechende Esterverbindungen, wie z.B. *5-(und-6)-carboxyfluorescein-succinimidylester* (5(6)-FAM). Die Verwendung dieser Derivate stellt ebenfalls eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung bezieht sich auf die Verwendung des PMCA-Inhibitors Caloxin 2A1 (Holmes, M. E. et al., (2003). *Cell Calcium* 33, 241-245; Chaudary J. et al., (2001), *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1027-1030).

Caloxin 2A1, ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz VSNSNWPSFPSSGGG, wirkt extrazellulär auf die PMCA. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass dieses Oligopeptid extrazellulär an die PMCA bindet und die Funktion der PMCA inhibitorisch beeinflusst.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Derivate von Caloxin 2A1 zur Hemmung der Spermienmobilität verwendet. Dabei bezeichnet der Begriff „Varianten von

Caloxin 2A1“ chemisch modifizierte Varianten des Peptids, d.h. auch zyklische und sämtliche anderen Derivate. Die im Peptid Caloxin 2A1 enthaltenen Aminosäuren bieten vielfältige Möglichkeiten der chemischen Modifikation, z.B. stellen die OH-Gruppen der zahlreichen Serine (S) oder auch die Amid-Gruppen der beiden Asparagin-Reste (N) gute Ansatzpunkte zur Modulation der Affinität des Peptids dar, wodurch auch hier die Bindungsaffinität an die PMCA4 moduliert werden kann und somit auch die inhibitorischen Eigenschaften auf die PMCA4 in Spermien verstärkend beeinflusst werden können.

Varianten von Caloxin 2A1 umfassen ebenfalls Insertions-, Deletions- und Substitutionsvarianten der Aminosäuresequenz des Polypeptids. Insertionsvarianten umfassen dabei amino- und/oder carboxyterminale Fusionen als auch Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäureresten innerhalb der Sequenz. Typischerweise umfasst eine Insertionsvariante eine Addition von 1-14, bevorzugt 1-7 Aminosäuren an die Aminosäuresequenz von Caloxin 2A1. Deletionsvarianten sind durch die Entfernung einer oder mehrerer Aminosäurereste vom Caloxin 2A1-Oligopeptid gekennzeichnet. Typischerweise werden nicht mehr als 2-6 Reste deletiert. Substitutionsvarianten kennzeichnen jene Varianten, in denen mindestens eine Aminosäure der Sequenz von Caloxin 2A1 entfernt und gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde. Im allgemeinen werden Aminosäuren gegen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften im Hinblick auf Hydrophobizität, Elektronegativität, Seitenketten und ähnliches ausgetauscht. Die Varianten weisen typischerweise die gleichen Eigenschaften wie unmodifiziertes Caloxin 2A1 auf.

In einer weiteren Ausführungsform ist die Erfindung auf die Verwendung des PMCA-Inibitors Spermin (Palacios, J. et al., (2003). *Biochim Biophys Acta* 1611, 197-203), ein Polykation, zur Hemmung der Spermienmobilität gerichtet. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Erfindung auf die Verwendung der Spermin-Derivate Spermin-Dihydrat und Spermin-tetrahydrochlorid gerichtet.

Alle drei Ausgangssubstanzen bieten vielfältige Möglichkeiten zur chemischen Modifikation, wodurch die Bindungsaffinität an die PMCA und somit die inhibitorischen Eigenschaften moduliert und verstärkt werden können.

Alle chemischen Modifikationen der Inhibitoren sind denkbar, solange die hemmende Wirkung der Derivate der Inhibitoren auf die Mobilität der Spermien noch erhalten bleibt. Die Mobilität der Spermien wird wie in Beispiel 3 der vorliegenden Anmeldung beschrieben bestimmt.

Die PMCA-Inhibitoren können auf verschiedene Weise verabreicht werden. In einer Ausführungsform der Erfindung werden die Inhibitoren oral, parenteral, als Beschichtung von mechanischen Verhütungsmitteln oder in Form von Cremes, Gels und Ölen verabreicht. Insbesondere bevorzugt ist dabei die Beschichtung von Präservativen und anderen mechanischen Verhütungsmitteln mit PMCA-Inhibitoren.

Die Verabreichungsdauer der PMCA-Inhibitoren kann variabel sein. Eine Ausführungsform der Erfindung ist darauf gerichtet, die Inhibitoren zur einmaligen Kontrazeption zu verwenden. Die Inhibitoren können jedoch auch mehrmals oder chronisch verabreicht werden. Die Dosierung der PMCA-Inhibitoren kann vom Fachmann mittels der im Stand der Technik bekannten Verfahren leicht ermittelt werden.

Die Verabreichung erfolgt an einen Säuger, vorzugsweise an einen Menschen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein PMCA-Inhibitor an einen Mann verabreicht. Die Verabreichung von PMCA-Inhibitoren an den Mann zur Empfängnisverhütung beruht daher auf einem völlig neuen Prinzip. Sie greift nicht in die Entwicklung der Spermien ein und hat deshalb auch nicht die Nebenwirkungen, die von Hormonpräparaten für Männer bekannt sind, wie dauerhafte Unfruchtbarkeit, "Verweiblichung" des Körpers, u.a. unerwünschte Nebenwirkungen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein PMCA-Inhibitor auch an eine Frau verabreicht. Reichern sich die PMCA-Inhibitoren im Mukus (Schleim) des Gebärmuttermundes oder in der Gebärmutter an, so wird beim Geschlechtsverkehr das Sperma, sobald es eintritt, in seiner Mobilität gehemmt und daher ein empfängnisverhütender Effekt erzielt.

Bevorzugt wird ein PMCA-Inhibitor sowohl an den Mann als auch an die Frau verabreicht, um den größtmöglichen empfängnisverhütenden Effekt zu erzielen.

Die Erfindung ist weiterhin auch auf ein Empfängnisverhütungsmittel gerichtet, das einen PMCA-Inhibitor in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger enthält. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Empfängnisverhütungsmittel nicht nur einen PMCA-Inhibitor, sondern eine Kombination von wenigstens zwei PMCA-Inhibitoren in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

Als pharmazeutisch verträglicher Träger können die üblichen festen oder flüssigen Trägerstoffe oder Verdünnungsmittel und die üblicherweise verwendeten pharmazeutisch-

technischen Hilfsstoffe entsprechend der gewünschten Applikationsart mit einer geeigneten Dosierung verwendet werden.

Erfnungsgemäße Empfängnisverhütungsmittel können auch in Kombination mit konventionellen Verhütungsmitteln verwendet werden, um Verhütungsmittelzusammensetzungen zu ergeben. Das konventionelle Verhütungsmittel kann dabei ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Kondomen, Diaphragmen, Verhütungsschaum etc.

So kann z. B. ein erfungsgemäßes Empfängnisverhütungsmittel zur Beschichtung eines Kondoms verwendet werden, um ein verbessertes konventionelles Verhütungsmittel mit verbesserter Verhütungswirkung zu erhalten. Wird Sperma mit derart beschichteten Verhütungsmitteln in Kontakt gebracht, wird die Spermienmobilität gehemmt und ein empfängnisverhütender Effekt erzielt.

Weiterhin ist die Erfindung auch auf die molekulare Untersuchung der PMCA, insbesondere des PMCA-kodierenden Gens gerichtet. Dies umfasst auch die Charakterisierung der PMCA-Isoformen und Splice-Varianten, als auch den Nachweis von Mutationen und anderen Veränderungen, wie z.B. posttranskriptioneller Veränderungen zur Diagnostik der Infertilität beim Mann.

Infertilität (d.h. Kinderlosigkeit trotz Kinderwunsch und normalem Geschlechtsverkehr) besteht bei etwa 15% aller Ehepaare. Bei ca. 40% dieser Fälle liegt die Ursache für die Infertilität beim männlichen Partner. Die Diagnostik dieses Leidens ist noch sehr unvollständig und insbesondere sind die genetischen Defekte, die zugrundeliegen können, nur in Ansätzen bekannt.

Da die PMCA-Isoform 4 auch in menschlichen Spermien exprimiert wird, liegt es in Analogie zum Mausmodell nahe, dass auch im menschlichen Organismus ein die PMCA4 betreffender Gendefekt Auswirkungen auf die Fertilität des Mannes hat. Eine Ausführungsform der Erfindung ist daher auf diagnostische Verfahren gerichtet, die den Nachweis umfassen, ob männliche Infertilität auf mangelnder Expression der PMCA mRNA oder einem Gendefekt des PMCA4-Gens beruht.

Das Expressionsniveau, sowie eventuelle Mutationen oder Polymorphismen im PMCA4-Gen und in den Genen, die für die anderen PMCA-Isoformen kodieren, können in Spermien im Ejakulat des Mannes mittels PCR und eventuell sich anschließender Sequenzierung, ELISA, Immunhistologischen Nachweis, Western Blot und PMCA-Aktivitätsbestimmung bestimmt

werden. Die Aktivitätsbestimmung der PMCA erfolgt dabei anhand aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren. Ergebnisse dieser Untersuchungen können als Ausgangsbasis zur Entwicklung geeigneter Therapien zur Behandlung der männlichen Infertilität entwickelt werden..

Die nachfolgenden Beispiele sind lediglich zur Veranschaulichung der Erfindung bestimmt und beschränken den Schutzmfang der Erfindung nicht.

## BEISPIELE

### Etablierung der PMCA4-defizienten Mauslinie

Aus zwei verschiedenen (heterozygot PMCA4-defizienten) embryonalen Stammzellklonen wurden Mauslinien erstellt, deren PMCA4-Gen durch homologe Rekombination deletiert wurde. Es wurde ein Bereich des Gens deletiert, der das Exon 2 sowie Teile des Exons 3 enthielt (Abb. 2). Durch die Einführung der Neomycinresistenz-Kasette wurden außerdem multiple Stop-Codons in allen drei Leserastern eingeführt, wodurch eine eventuelle Expression eines aberranten Proteins ("Durchleseprodukt" oder "*Splicing*"-Varianten) ausgeschlossen wurde. Insgesamt wurden 14 männliche und 6 weibliche Chimären geboren. Die männlichen Tiere wurden mit C57Bl/6-Tieren verpaart. Bei mehreren chimären Mäusen konnte die Integration des zerstörten Allels in die Keimbahn nachgewiesen werden. Die männlichen PMCA-defizienten Tiere waren infertil, während weiblichen Mäuse eine normale Fertilität aufwiesen.

### Expressionanalyse der PMCA4 in murinen und menschlichen Spermien

Die Expression der PMCA4 in murinen und menschlichen Spermien wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt. Teil A von Abb. 1 zeigt, dass Mausspermien eine starke Expression der PCMA4 im Akrosom und im Schwanz aufweisen (rote Färbung, 2. Bild in A). Im Vergleich dazu das Phasenkontrastbild des isolierten Spermiums. Die beiden rechten Bilder zeigen die Negativ-Kontrolle des sekundären Antikörpers alleine im Vergleich zur Phasenkontrast-Aufnahme der beiden Spermien. Teil B von Abb. 1 zeigt, dass humane Spermien ebenso wie Mausspermien die PMCA4 im Akrosom und Schwanz exprimieren. Exemplarisch ist hier nur die Färbung der PCMA4 dargestellt.

### Hemmung der Spermienmobilität durch PMCA-Inhibitoren

Die Hemmung der Funktionalität der Spermien, d.h. die Hemmung der Mobilität wurde wie folgt bestimmt:

PMCA4-defiziente männliche Mäuse wurden getötet und die Nebenhoden präpariert. Diese wurden in 2 ml Spermien-Präparationsmedium ("Sperm Preparation Medium" der Firma MediCult a/s, Møllehaven 12, 4040 Jyllinge, Denmark, Komponenten: Earle's balancierte Salzlösung, Natriumpyruvat, synthetischer Serumersatz, HEPES, Natriumbicarbonat, menschliches Serumalbumin; Penicillin 50,000 IU/Liter und Streptomycin 50 mg/Liter; Kahn, J.A., *Human Reproduction* 8/9, Seiten 1414-1419, 1993; Lähteenmäki, A., *Human Reproduction* 10/1, Seiten 142-147, 1995) gebracht und darin mit einem sterilen Skalpell angeritzt. Den funktionierenden Spermien wurde 15 min Zeit gegeben aus dem Nebenhoden heraus zu schwimmen, der Spermien enthaltende Überstand wurde abgenommen und mit jeweils 500 µl steigenden Konzentrationen 5- und 6-Carboxyeosindiacetat-succinimidylester (CE) versetzt. Danach wurden die Spermien 1 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit diffundiert CE in die Spermien und der Ester wird intrazellulär hydrolysiert. Anschließend wurden die sich bewegenden Spermien in Relation zu den unbeweglichen ausgezählt und folgende Ergebnisse erzielt:

**Tabelle I**

**Hemmung der Spermienmobilität durch 5- und 6-CE-succinimidylester (CE)**

Konzentration CE (µM)	5 µM	20 µM	100 µM
Unbewegliche Spermien	30% <sup>a</sup>	90%	95%

<sup>a</sup> Die Rate von etwa 30% unbeweglichen Spermien in Abwesenheit von Inhibitor ist bei Präparationen aus dem Nebenhoden normal

Die Hemmung der Spermienmobilität wurde weiterhin mit dem CASA System 4.2 der Firma medeaLAB, Erlangen, Deutschland, automatisiert ausgewertet. Die Präparation der Spermien und die Zugabe des Inhibitors erfolgte dabei wie vorstehend beschrieben. Mit dem CASA-System wurden die folgenden drei Gruppen untersucht:

Gruppe A (unbehandelte, normale Spermien, 45 min nach Präparation, 37°C); Gruppe B (PMCA-defiziente Spermien, 45 min nach Präparation, 37°C); Gruppe C (normale Spermien,

45 min nach Präparation, 37°C, davon 30 min mit 20  $\mu$ M des intrazellulären Inhibitors 5-und 6-CE).

Bei dieser Messung wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

Gruppe A: Progressive Motilität 73%, Ortsbeweglich bzw. immotil 27 %, n= 254 Spermien;

Gruppe B: Progressive Motilität 14 %, Ortsbeweglich bzw. immotil 86 %, n= 198 und Gruppe

C: Progressive Motilität 22 %, Ortsbeweglich bzw. immotil 78 %, n=217.

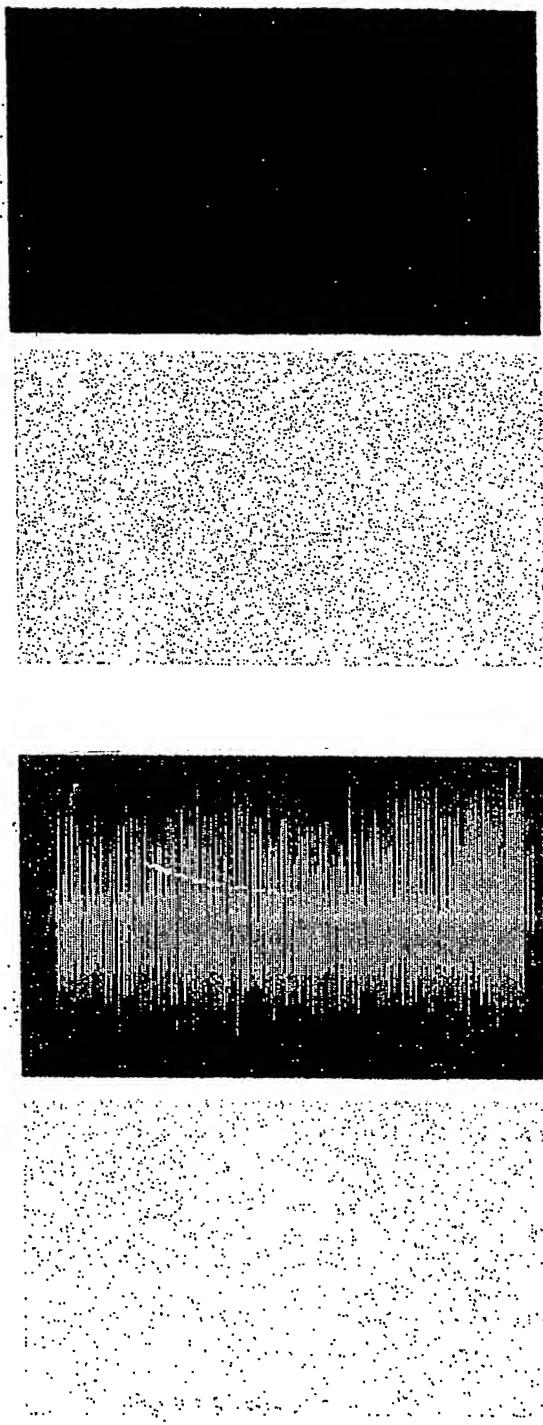
Dabei ist zu beachten, dass die Inkubationszeit (gegenüber der manuellen Auszählung) verkürzt war (nur 30 min statt 1 h) und das die Software auch irrelevante durchschwimmende Objekte erfasst, die bei manueller Auszählung ausgeschlossen werden können.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung eines Inhibitors der Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) zur Hemmung der Spermienmobilität zur Bewirkung der Empfängnisverhütung.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei der Inhibitor gegen eine der vier Isoformen der Plasmamembran-Calcium-ATPase PMCA gerichtet ist.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei der Inhibitor gegen die Isoform PMCA4 gerichtet ist.
4. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1-3, wobei der Inhibitor 5- oder 6-Carboxyeosindiacetat-succinimidylester oder ein Eosin- oder Fluoresceinderivat davon ist.
5. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1-3, wobei der Inhibitor Caloxin 2A1 oder ein Derivat davon ist.
6. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1-3, wobei der Inhibitor Spermin oder ein Derivat davon ist.
7. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1-6, wobei der Inhibitor oral, parenteral, oder als Beschichtung von mechanischen Verhütungsmitteln verabreicht wird.
8. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1-7, wobei die Inhibitoren zur einmaligen Empfängnisverhütung oder chronisch als Empfängnisverhütungsmittel verabreicht werden.
9. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1-8, wobei die Inhibitoren an einen Säuger, vorzugsweise an einen Menschen verabreicht werden.
10. Empfängnisverhütungsmittel, das einen PMCA-Inhibitor in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.
11. Empfängnisverhütungsmittel gemäß Anspruch 10, wobei das Empfängnisverhütungsmittel in Kombination mit einem konventionellen Empfängnisverhütungsmittel vorliegt.
12. Empfängnisverhütungsmittel nach Anspruch 11, wobei das konventionelle Empfängnisverhütungsmittel ein Kondom ist.

13. Verfahren zur Infertilitätsdiagnostik beim Mann, wobei die Diagnose auf dem Nachweis von Mutationen oder von post-translationellen Modifikationen des PMCA-kodierenden Gens beruht.

Abb. 1

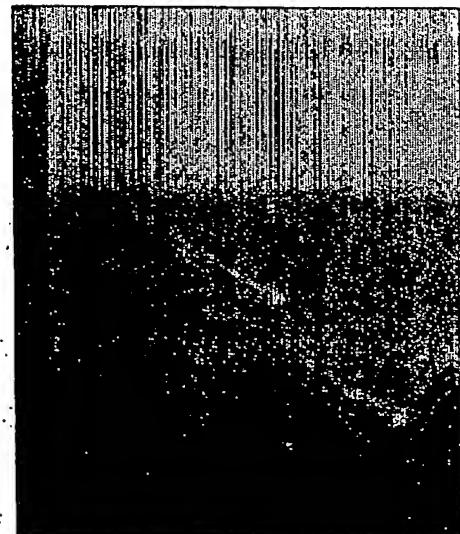


A

B

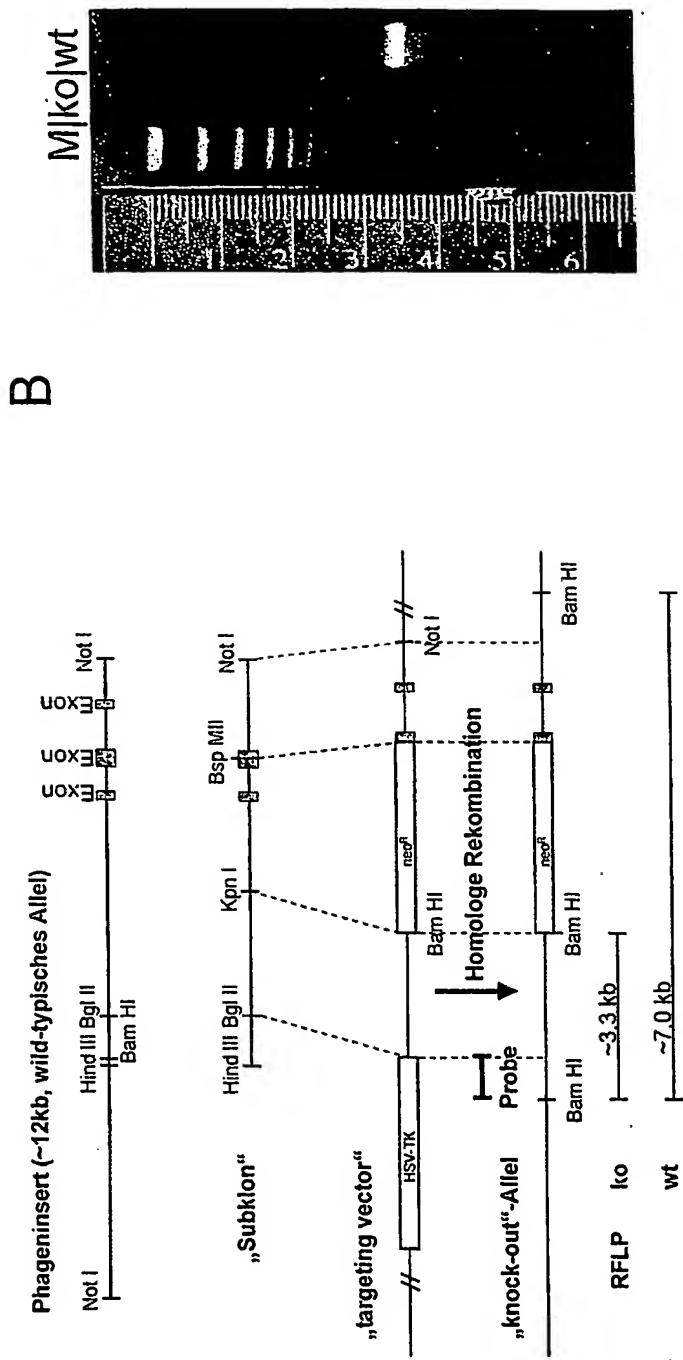
Abbildung 1: Expression der PMCA4 in isolierten Spermien.

A: Mauspermien weisen eine starke Expression der PMCA4 im Akrosom und im Schwanz auf (Färbung, 2. Bild in A). Im Vergleich dazu das Phasenkontrastbild des isolierten Spermiums. Die beiden rechten Bilder zeigen die Negativ-Kontrolle des sekundären Antikörpers alleine im Vergleich zur Phasenkontrast-Aufnahme der beiden Spermien.



B: Ebenso wie die Mausspermien exprimieren humane Spermien die PMCA4 im Akrosom und Schwanz. Exemplarisch ist hier nur die Färbung der PMCA4 dargestellt.

Abb. 2



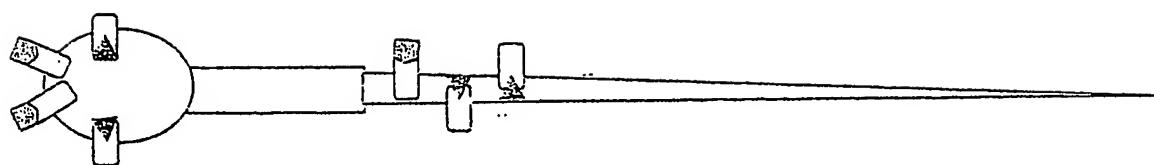
Additionaly 2. [www.fimca.org/ewi](http://www.fimca.org/ewi)

A: Durch eine geeignete Strategie konnte das PMCA4-Gen in der Maus ausgeschaltet werden. Unter Zuhilfenahme eines sog. "Targeting-Vektors" wurde mittels homologischer Rekombination ein Exon komplett und ein Teil eines weiteren Exons deletiert.

B: Die Genmanipulation resultierte in einem vollständigen Verlust der Genexpression in PMCA4-defizienten Mäusen ("ko"), wohingegen die normalen Mäuse die PMCA4 stark in Spermien exprimieren ("wt").  $\text{wt} = \text{Marker}$  zur Größenbestimmung des RT-PCR-Products.

C: Die nach der Genmanipulation erhaltenen männlichen PMCA4-defizienten Tiere (ko) sind infertil, unabhängig davon ob man sie mit normalen oder ebenfalls PMCA4-defizienten weiblichen Tieren verpaart.

6



□ PMCA4

▲ intrazell. Inhibitor

■ extrazell. Inhibitor

**Abb. 3**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/007168

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 A61K31/343 A61K31/352 A61P15/16 A61P15/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>SCHUH KAI ET AL: "Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility"          JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, no. 27, 2 July 2004 (2004-07-02), pages 28220-28226, XP008036550          ISSN: 0021-9258          page 28225, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-4,7-10

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2004

Date of mailing of the international search report

24.01.2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bonzano, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007168

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KANWAR U ET AL: "GOSSYPOL INHIBITION OF CA++ UPTAKE AND CA++-ATPASE IN HUMAN EJACULATED SPERMATOZOAL PLASMA MEMBRANE VESICLES" CONTRACEPTION, GERON-X, INC., LOS ALTOS, CA, US, vol. 39, no. 4, 1 April 1989 (1989-04-01), pages 431-445, XP000561575 ISSN: 0010-7824 abstract page 442, paragraph 1 page 432, paragraph 2 -----	1-3,7-10
X	BREITBART H ET AL: "THE ROLE OF CALCIUM AND CA2+-ATPASE IN MAINTAINING MOTILITY IN RAM SPERMATOZOA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 260, no. 21, 25 September 1985 (1985-09-25), pages 11548-11553, XP001009929 page 11548, column 2, paragraph 2 page 11552, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 4	1-3
Y	PATNI ANIL K ET AL: "Role of intracellular calcium in the spermicidal action of 2',4'-dichlorobenzamil, a novel contact spermicide" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, vol. 53, no. 10, October 2001 (2001-10), pages 1387-1392, XP008036557 ISSN: 0022-3573 abstract page 1387, paragraph 2 -----	1-4,7-12
X	PATNI ANIL K ET AL: "Role of intracellular calcium in the spermicidal action of 2',4'-dichlorobenzamil, a novel contact spermicide" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, vol. 53, no. 10, October 2001 (2001-10), pages 1387-1392, XP008036557 ISSN: 0022-3573 abstract page 1387, paragraph 2 -----	1-3,7-11
Y	SCHUH KAI ET AL: "The sarcolemmal calcium pump PMCA: An effector of platelet aggregation." CIRCULATION, vol. 106, no. 19 Supplement, 5 November 2002 (2002-11-05), pages II-79, XP008036566 & ABSTRACTS FROM SCIENTIFIC SESSIONS; CHICAGO, IL, USA; NOVEMBER 17-20, 2002 ISSN: 0009-7322 the whole document -----	4 1-4,7-12
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/007168

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YANG Z ET AL: "Na+-Ca <sup>2+</sup> exchange activity is localized in the T-tubules of rat ventricular myocytes" CIRCULATION RESEARCH, vol. 91, no. 4, 23 August 2002 (2002-08-23), pages 315-322, XP008036552 ISSN: 0009-7330 abstract -----	4
A	EP 0 552 108 A (UNIV MARYLAND) 21 July 1993 (1993-07-21) page 15, line 50; claim 11 -----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

EP2004/007168

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**SEE SUPPLEMENTAL SHEET**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**1-4, 7-12 (partly)****Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-4, 7-12 (in part)

use of the 5- or 6-carboxyeosin acetate succimidyl ester inhibitor of plasma membrane calcium ATPase to inhibit sperm mobility for purposes of contraception, alone or in combination with a conventional contraceptive.

---

2. Claims 1-4, 7-12 (in part)

use of eosin derivative inhibitors of plasma membrane calcium ATPase to inhibit sperm mobility for purposes of contraception, alone or in combination with a conventional contraceptive.

---

3. Claims 1-4, 7-12 (in part); 5

use of fluorescein derivative inhibitors of plasma membrane calcium ATPase to inhibit sperm mobility for purposes of contraception, alone or in combination with a conventional contraceptive.

---

4. Claims 1-4, 7-12 (in part); 5

use of the caloxin 2A1 or derivative inhibitor of plasma membrane calcium ATPase to inhibit sperm mobility for purposes of contraception, alone or in combination with a conventional contraceptive.

---

5. Claims 1-4, 7-12 (in part); 6

use of the spermin or derivative inhibitor of plasma membrane calcium ATPase to inhibit sperm mobility for purposes of contraception, alone or in combination with a conventional contraceptive.

---

6. Claim 13

method of diagnosing male infertility, the diagnosis involving evidence of mutation or modification of the gene coding for PMCA.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/007168

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0552108	A 21-07-1993	CA 2087413	A1	18-07-1993
		DE 69326967	D1	16-12-1999
		DE 69326967	T2	15-06-2000
		EP 0552108	A2	21-07-1993
		JP 3325939	B2	17-09-2002
		JP 6066802	A	11-03-1994
		US 5631169	A	20-05-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/007168

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K31/343 A61K31/352 A61P15/16 A61P15/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>SCHUH KAI ET AL: "Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 279, Nr. 27, 2. Juli 2004 (2004-07-02), Seiten 28220-28226, XP008036550 ISSN: 0021-9258 Seite 28225, Spalte 1, Absatz 2 - Spalte 2, Absatz 1</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-4,7-10

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

6. Oktober 2004

24.01.2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bonzano, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/007168

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KANWAR U ET AL: "GOSSYPOL INHIBITION OF CA++ UPTAKE AND CA++-ATPASE IN HUMAN EJACULATED SPERMATOZOAL PLASMA MEMBRANE VESICLES" CONTRACEPTION, GERON-X, INC., LOS ALTOS, CA, US, Bd. 39, Nr. 4, 1. April 1989 (1989-04-01), Seiten 431-445, XP000561575 ISSN: 0010-7824 Zusammenfassung Seite 442, Absatz 1 Seite 432, Absatz 2 -----	1-3,7-10
X	BREITBART H ET AL: "THE ROLE OF CALCIUM AND CA2+-ATPASE IN MAINTAINING MOTILITY IN RAM SPERMATOZOA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 260, Nr. 21, 25. September 1985 (1985-09-25), Seiten 11548-11553, XP001009929 Seite 11548, Spalte 2, Absatz 2 Seite 11552, Spalte 1, Absatz 3 - Spalte 2, Absatz 4	1-3
Y	PATNI ANIL K ET AL: "Role of intracellular calcium in the spermicidal action of 2',4'-dichlorobenzamil, a novel contact spermicide" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, Bd. 53, Nr. 10, Oktober 2001 (2001-10), Seiten 1387-1392, XP008036557 ISSN: 0022-3573 Zusammenfassung Seite 1387, Absatz 2 -----	1-4,7-12
X	SCHUH KAI ET AL: "The sarcolemmal calcium pump PMCA: An effector of platelet aggregation." CIRCULATION, Bd. 106, Nr. 19 Supplement, 5. November 2002 (2002-11-05), Seiten II-79, XP008036566 & ABSTRACTS FROM SCIENTIFIC SESSIONS; CHICAGO, IL, USA; NOVEMBER 17-20, 2002 ISSN: 0009-7322 das ganze Dokument -----	1-3,7-11
Y		4
Y		1-4,7-12
		-/-

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2004/007168
---

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	YANG Z ET AL: "Na+-Ca <sup>2+</sup> exchange activity is localized in the T-tubules of rat ventricular myocytes" CIRCULATION RESEARCH, Bd. 91, Nr. 4, 23. August 2002 (2002-08-23), Seiten 315-322, XP008036552 ISSN: 0009-7330 Zusammenfassung -----	4
A	EP 0 552 108 A (UNIV MARYLAND) 21. Juli 1993 (1993-07-21) Seite 15, Zeile 50; Anspruch 11 -----	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/007168

### Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

### Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

**siehe Zusatzblatt**

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
**1-4, 7-12 (teilweise)**

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p>
1. Ansprüche: 1-4,7-12 (teilweise)	<p>Verwendung des Inhibitors der Plasmamembran- Calcium- ATPase 5 oder 6-Carboxyeosinacetat-succimidylester, zur Hemmung der Spermienmobilität zur Bewirkung der Empfängnisverhütung, allein oder in Kombination mit einem konventionellen Empfängnisverhütungsmittel.</p> <p>---</p>
2. Ansprüche: 1-4,7-12 (teilweise)	<p>Verwendung der Inhibitoren der Plasmamembran- Calcium- ATPase, Eosinderivaten, zur Hemmung der Spermienmobilität zur Bewirkung der Empfängnisverhütung, allein oder in Kombination mit einem konventionellen Empfängnisverhütungsmittel.</p> <p>---</p>
3. Ansprüche: 1-4,7-12 (teilweise)	<p>Verwendung der Inhibitoren der Plasmamembran- Calcium- ATPase, Fluoresceinderivaten, zur Hemmung der Spermienmobilität zur Bewirkung der Empfängnisverhütung, allein oder in Kombination mit einem konventionellen Empfängnisverhütungsmittel.</p> <p>---</p>
4. Ansprüche: 1-3,7-12 (teilweise); 5	<p>Verwendung des Inhibitores der Plasmamembran- Calcium- ATPase, Caloxin 2A1 oder eines Derivates davon, zur Hemmung der Spermienmobilität zur Bewirkung der Empfängnisverhütung, allein oder in Kombination mit einem konventionellen Empfängnisverhütungsmittel.</p> <p>---</p>
5. Ansprüche: 1-3,7-12 (teilweise);6	<p>Verwendung des Inhibitores der Plasmamembran- Calcium- ATPase, Spermin oder eines Derivates davon, zur Hemmung der Spermienmobilität zur Bewirkung der Empfängnisverhütung, allein oder in Kombination mit einem konventionellen Empfängnisverhütungsmittel.</p> <p>---</p>
6. Anspruch: 13	<p>Verfahren zur Infertilitätsdiagnostik beim man, wobei die Diagnose auf dem Nachweis von Mutationen oder Modifikationen des PMCA-kodierenden Gens beruht.</p>

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/007168

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0552108	A 21-07-1993	CA	2087413 A1	18-07-1993
		DE	69326967 D1	16-12-1999
		DE	69326967 T2	15-06-2000
		EP	0552108 A2	21-07-1993
		JP	3325939 B2	17-09-2002
		JP	6066802 A	11-03-1994
		US	5631169 A	20-05-1997

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**